

ยุทธศาสตร์ทางพันธุศาสตร์สู่ความสำเร็จในการผลิต เซลลูโลสิกเอทานอล

Genetic strategies to accomplish cellulosic ethanol production

ธนธร วิทิตานนท์ ชมภูณูช วิรุณานนท์ และ วรวุฒิ จุฬาลักษณ์นากุล*

Tanathorn Vitisan, Chompunuch Virunanon and Warawut Chulalaksananukul*

หน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

* Corresponding author: warawut.c@chula.ac.th

บทคัดย่อ

การผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงจะมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อมวลมนุษยชาติในอนาคตอันใกล้นี้ เนื่องจากการผลิตเอทานอลปัจจุบัน ใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลจากอ้อยและแป้งจากมันสำปะหลัง ซึ่งสารตั้งต้นเหล่านี้ จัดเป็นอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์ จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตเป็นเชื้อเพลิงเหลว การนำมวลชีวภาพที่มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ มาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเป็นเชื้อเพลิงเหลว จึงเป็นทางเลือกใหม่อีกทางหนึ่ง ที่จะลดปัญหาการแก่งแย่งพื้นที่เพาะปลูกอาหารไปได้ อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลยังมีประเด็นสำคัญที่เป็นอุปสรรคในการผลิตเป็นเชื้อเพลิงเหลว คือราคาที่ยังสูงกว่าเชื้อเพลิงปิโตรเลียม ในบทความนี้ได้กล่าวถึงยุทธศาสตร์ที่น่าจะเป็นประโยชน์ในการวิจัย เพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอล ให้ได้พลังงานทดแทนที่มีศักยภาพ และให้ความคุ้มค่าหรือผลตอบแทนในเชิงพาณิชย์ที่ยอมรับได้ โดยสามารถแบ่งวิธีการวิจัยพัฒนาในปัจจุบันได้เป็นสามแนวทาง คือ ยุทธศาสตร์ที่ 1 การผลิตเอนไซม์ไฮโดรลิซิสในพืช ยุทธศาสตร์ที่ 2 การ

ปรับสภาพมวลชีวภาพโดยควบคุมคุณสมบัติของลิกนินและเซลลูโลส และยุทธศาสตร์ที่ 3 การเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในชีวมวลเพื่อเพิ่มผลิตภัณฑ์เอทานอล ด้วยยุทธศาสตร์ทางพันธุศาสตร์ดังกล่าวนี้จะส่งเสริมร่วมกันเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเซลลูโลสิกเอทานอล ให้ใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนได้จริงในอนาคตอันใกล้

ABSTRACT

Cellulosic ethanol production is one of the fuels which play an important role for human nature in the near future. However, ethanol production at present uses sugar feedstock substrate from sugar cane and starch from cassava. These substrates are food resources for human and animals thus are not appropriate substrates for liquid fuel production. For this reason, cellulosic biomass from cellulose and hemicellulose is an alternative option for liquid fuel production to overcome competitive problems on food cultivated area. However, higher cost of cellulosic ethanol production than petroleum fuels is

an important issue that has an impact on liquid fuel manufacture. In this review, useful strategies for cellulosic ethanol process improvement are described in order to create potent alternative energy with economically and commercially acceptable profit. The strategies can be divided into three parts: first, production of hydrolysis enzyme by plant; second, pretreatment of biomass by controlling lignin and cellulose property; and third, increasing polysaccharide amount in biomass for ethanol fermentation. In summary, all strategies will be enhanced together to access the goal to develop the use of cellulosic ethanol in the near future.

คำสำคัญ: เชื้อเพลิงชีวภาพ การปรับสภาพชีวมวล พอลิแซ็กคาไรด์ กระบวนการชีวภาพ ตัวเร่งชีวภาพ

Keywords: biofuels, biomass pretreatment, polysaccharide, bioprocess, biocatalyst

บทนำ

ปัจจุบันภาวะโลกร้อน กำลังเป็นปัญหาที่ทั่วโลกต่างให้ความสนใจ สาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน คือ การมีปริมาณก๊าซเรือนกระจกในบรรยากาศเพิ่มมากขึ้น ก๊าซที่สำคัญ คือ คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสาเหตุหนึ่งที่สำคัญเกิดจากการเผาไหม้จากเชื้อเพลิงปิโตรเลียม และการตัดไม้ทำลายป่า แนวทางในการแก้ไขปัญหานี้วิธีหนึ่ง คือ การหันมาใช้พลังงานทดแทนให้มากขึ้น และจะช่วยแก้ปัญหาหาค่าน้ำมันแพงในขณะนี้ได้อีกด้วย ดังนั้นการศึกษาหาแหล่งพลังงานทดแทน ที่สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้ หรือใช้ได้ไม่มีวันหมด (renewable energy) จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง แหล่งพลังงานทดแทน ได้แก่ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานลม และเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) เป็นต้น ไบโอเอทานอลจัดเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่กำลังได้รับความสนใจในขณะนี้ เนื่องจากสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้โดยตรงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล โดยใช้ใน

รูปน้ำมันเชื้อเพลิงผสม เช่นนำไปผสมกับน้ำมันเบนซินเรียกว่า แก๊สโซฮอล์ หรือผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีทั้งป่าไม้ พืชผลทางการเกษตร และปศุสัตว์มากมาย นับเป็นประเทศหนึ่งที่มีการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรมากในลำดับต้นๆ ของโลก ดังนั้นการส่งเสริมให้มีการใช้พลังงานจากมวลชีวภาพ ถือว่าเหมาะสมตามบริบทที่เป็นอยู่ของประเทศ จากการที่ประเทศไทยมีฐานชนิดต่างๆ มากมายทั้งที่ขึ้นได้เองตามธรรมชาติ รวมทั้งที่มีการปลูกขึ้นมา อีกทั้งยังมีการเจริญเติบโตรวดเร็ว เก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลายครั้งต่อปี จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเซลล์ลูโลส เอทานอล นอกจากนี้การที่มีผลผลิตทางการเกษตรมาก จึงทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมากตามไปด้วย โดยในแต่ละปีรวมกันมีปริมาณนับพันล้านตัน (Perlack *et al.*, 2008) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ถึงแม้ว่าจะมีการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ เป็นวัสดุในการเพาะปลูก ทำปุ๋ยหมัก หรือผลิตภัณฑ์เครื่องใช้ต่างๆ เป็นต้น แต่ก็ยังมีเหลืออีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ และนอกจากนี้ก็ยังเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้มากขึ้น เมื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล แม้ว่าเอทานอลจะเป็นพลังงานทดแทน ที่ให้ประโยชน์ต่อเศรษฐกิจของประเทศได้ดีในระดับหนึ่ง การเลือกใช้วัตถุดิบเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิต ยังคงต้องได้รับการวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้พลังงานทดแทนที่มีศักยภาพ และให้ความคุ้มค่าหรือผลตอบแทนในเชิงพาณิชย์ที่ยอมรับได้ อันจะนำไปสู่การเป็นทางเลือกในการใช้พลังงานเชื้อเพลิงทดแทนที่เป็นรูปธรรมชัดเจน

ไบโอเอทานอล คือ เอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ ซึ่งมีวัตถุดิบตั้งต้นเป็นแป้งหรือน้ำตาล การนำแป้งและน้ำตาลที่มาจากมันสำปะหลัง ข้าวโพด หรืออ้อยมาใช้นั้น อาจส่งผลกระทบต่อแหล่งอาหารของมนุษย์ได้ ในบางประเทศ

การปลูกพืชเพื่อนำมาใช้ในการผลิตเป็นพลังงานนั้น เป็นไปได้ยาก ดังนั้นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว หญ้า ชานอ้อย ชังข้าวโพด เป็นต้น จึงนับเป็นวัตถุดิบทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาผลิตเป็นเอทานอล เพราะมีราคาถูกหรืออาจเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่ไม่มีมูลค่า จึงต้องนำไปเผาทำลายสร้างปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกันไป โดยพบว่าเฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นไซโลสซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลที่มีคาร์บอนห้าอะตอมเป็นองค์ประกอบ ส่วนเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลที่มีคาร์บอนหกอะตอมเป็นองค์ประกอบ ส่วนลิกนินเป็นองค์ประกอบส่วนน้อยและไม่สามารถย่อยให้เป็นน้ำตาลได้ ดังนั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (cellulosic material) เมื่อผ่านการย่อยให้เป็นน้ำตาลแล้ว ก็จะสามารถนำเข้าสู่กระบวนการหมักจนได้เอทานอลซึ่งเรียกว่า เซลลูโลสเอทานอล

การผลิตเซลลูโลสเอทานอลประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) เพื่อให้วัตถุดิบมีพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้น และมีโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย ได้แก่ กระบวนการไฮโดรลิซิส (hydrolysis) ด้วยกรดหรือเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาล และการหมัก (fermentation) เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์หรือแบคทีเรีย

อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญในกระบวนการผลิตเซลลูโลสเอทานอล อยู่ที่ต้นทุนการผลิตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเอทานอลจากแป้งหรือน้ำตาลโดยตรง ซึ่งต้นทุนการผลิตส่วนใหญ่จะอยู่ที่ขั้นตอนการผลิตเอนไซม์ และขั้นตอนของกระบวนการปรับสภาพ เพื่อให้เหมาะสมต่อกระบวนการหมักดังแสดงใน Figure 1 ซึ่งส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงกว่าการผลิตจากแป้งหรือน้ำตาล 2-3 เท่า ด้วยเหตุนี้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมจึงก้าวเข้ามามีบทบาทสำคัญในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว (Mosier, 2005) โดย

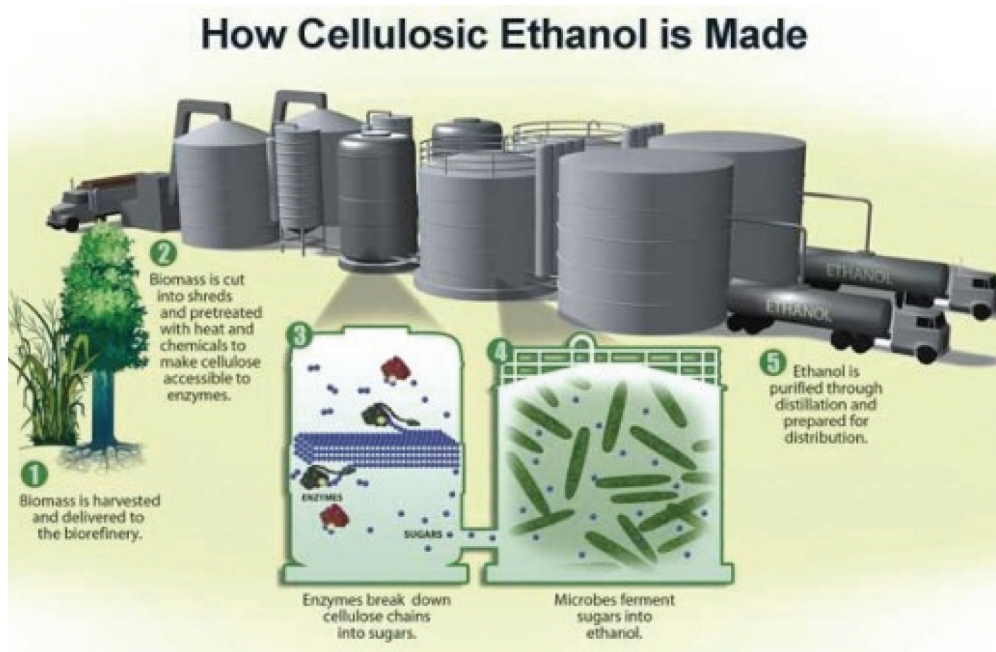


Figure 1 Production of bioethanol from different carbon sources especially sugar, starch and lignocelluloses (<http://www.judeclemente.com/renewables>).

มียุทธศาสตร์สู่ความสำเร็จในการผลิตเซลล์โฮสต์เอทานอลที่สำคัญดังนี้ (1) ลดการใช้เอนไซม์ในระบบโดยสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลายตัวเองได้ในสภาวะที่กำหนด (2) ลดขั้นตอนการปรับสภาพ โดยผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกนินหรือเซลลูโลสคริสตัลไลน์ให้ดีขึ้น (3) การเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในพืชเพื่อเพิ่มผลิตภัณฑ์เอทานอล โดยควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในพืช

ยุทธศาสตร์ที่ 1 การผลิตเอนไซม์ไฮโดรลิซิสในพืช

ปัจจุบันปัญหาที่สำคัญในกระบวนการผลิตเซลล์โฮสต์เอทานอลอย่างหนึ่งคือ การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์สำหรับย่อยผนังเซลล์พืชนั้นยังมีต้นทุนการผลิตสูงอยู่ นักวิจัยจึงได้มีความพยายามที่จะหาแหล่งผลิตเอนไซม์ทางเลือก ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้ว พืชเป็นอีกทางเลือกที่มีศักยภาพ ในการผลิตเอนไซม์ หรือแม้กระทั่งสารชีวโมเลกุลอื่นๆ (Fischer *et al.*, 2004; Sticklen, 2006) ผวนกับความก้าวหน้าทางด้านพันธุวิศวกรรม เหล่านี้ทำให้ด้านเซลล์โฮสต์เอทานอล จึงได้สนใจที่จะสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม ให้สามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยโครงสร้างของผนังเซลล์ และสามารถกำหนดระยะเวลาได้ เพื่อเป็นการลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตเซลล์โฮสต์เอทานอล

พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถผลิตไฮโดรลิติกเอนไซม์ จะสร้างเอนไซม์และเกิดการสะสมที่บริเวณไซโทซอล (cytosol) การสกัดเอนไซม์เหล่านี้จึงอยู่ในรูปแบบของปริมาณโปรตีนละลายทั้งหมด (total soluble protein) (Teymouri *et al.*, 2004; Ransom *et al.*, 2007) ซึ่งทำได้ง่ายและรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องศึกษาถึงความเสถียร (stability) และกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป หากมองยุทธศาสตร์ในการดัดแปลงพันธุกรรมพืช มีสองประเด็นที่น่าสนใจคือ (1) การเพิ่มระดับการผลิตเอนไซม์ในพืชให้ได้ปริมาณมาก (2) การเพิ่มประสิทธิภาพของ heterologous

enzyme ตัวอย่างเช่น ข้าวและข้าวโพด (Oraby *et al.*, 2007) ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมให้สามารถผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) ซึ่งโดยทั่วไปสามารถผลิตได้เพียง 5% และ 2% ของปริมาณโปรตีนละลายทั้งหมดตามลำดับเท่านั้น ฉะนั้นหากต้องการแทนที่ปริมาณเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจากจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบการผลิต จำเป็นต้องสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้มากถึง 10% ของปริมาณโปรตีนละลายทั้งหมด

นอกจากนี้ยังควมมีปัจจัยอีกหลายด้านที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรม ตัวอย่างเช่น บริเวณที่อยู่ของโปรตีน ซึ่งได้มีการรายงานไว้ว่า โปรตีนที่อยู่บริเวณลูเมน (lumen) ของเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (endoplasmic reticulum, ER) จะมีความเสถียรมากกว่าโปรตีนบริเวณไซโทซอลประมาณ 2-10 เท่า ซึ่งจะสามารถส่งผลให้มีกิจกรรมที่ดีกว่าด้วย (Schillberg *et al.*, 2003) ดังนั้นหากสามารถดัดสัญญาณให้ยีนที่ผลิตเอนไซม์ ไปแสดงออกที่บริเวณเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม และสะสมอยู่ที่บริเวณนั้น ก็อาจจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถจะเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ได้

ถึงแม้ว่าจะมีการทดลองดัดแปลงพันธุกรรมพืชให้ผลิตไฮโดรลิติกเอนไซม์อย่างกว้างขวาง แต่การทดลองส่วนใหญ่ยังคงอยู่ในระดับของพืชต้นแบบ เช่น ต้นยาสูบ อัลฟัลฟา (alfalfa) ซึ่งไม่ใช่พืชที่ไม่มีศักยภาพที่จะนำมาผลิตเซลล์โฮสต์เอทานอลได้ หากแต่การทดลองต่างๆ ก็แสดงให้เห็นถึงผลเสียจากการสะสมของโปรตีนที่ผลิตจากการยีนของสิ่งมีชีวิตอื่น (heterologous protein) ในบริเวณไซโทซอล (Ziegler *et al.*, 2000) เนื่องจากโปรตีนนี้จะไปรบกวนวิถีเมแทบอลิซึม ที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของเซลล์ การให้เอนไซม์จากภายนอกสะสมอยู่บริเวณอะพอพลาสต์ (apoplast) จึงเป็นอีกแนวทางที่ได้รับความสนใจ เพราะว่าเป็นบริเวณที่สามารถสะสมโปรตีนได้เป็นจำนวนมาก และรบกวนระบบต่างของเซลล์น้อยกว่าบริเวณไซโทซอล (Yamamura *et al.*, 2003)

ยุทธศาสตร์ที่ 2 การปรับปรุงสภาพมวลชีวภาพโดยควบคุมคุณสมบัติของลิกนินและเซลลูโลส

ขั้นตอนในการปรับปรุงสภาพพืชก่อนเข้ากระบวนการผลิตนั้น เป็นอีกขั้นตอนที่ต้องใช้ต้นทุนมาก ทั้งด้านพลังงานและสารเคมี ด้วยเหตุนี้หากสามารถดัดแปลงพันธุกรรมพืชให้มีความเหมาะสมต่อการผลิต โดยลดขั้นตอนกระบวนการปรับปรุงสภาพให้น้อยที่สุด จึงเป็นอีกหนึ่งยุทธศาสตร์ที่สำคัญ เป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่า ลิกนินจะไปขัดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของเซลลูโลสกับเอนไซม์ในปฏิกิริยาการย่อย ดังนั้นในการผลิตจะต้องแยกส่วนประกอบดังกล่าวออกจากโครงสร้าง ซึ่งหากสามารถลดปริมาณลิกนินในพืชวัตถุดิบได้ ก็จะเป็นการลดต้นทุนในการปรับปรุงสภาพเพื่อกำจัดลิกนินออกได้อย่างมาก

ลิกนิน คือ อนุพันธ์ของพาราคูมาริล (paracoumaryl) ซึ่งปัจจุบันยังไม่ทราบเอนไซม์อีกหลายชนิดในวิธีการสังเคราะห์ (Ragauskas *et al.*, 2006) แต่นักพันธุวิศวกรรมก็ได้พยายามที่จะลดปริมาณของลิกนิน โดยการลดปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์ลิกนินลง ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เทคนิคแอนติเซนส์ (anti-sense) หรือ อาร์เอ็นเอ อินเทอร์เฟียร์เรนซ์ (RNA interference, RNAi) ในการควบคุมปริมาณเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น การทดลองลดปริมาณเอนไซม์ 4-coumarate-3-hydroxylase (C3H) ด้วยเทคนิคแอนติเซนส์ที่ทดลองกับต้นอัลฟัลฟา พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้างของลิกนินอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ C3H นั้น เกิดความบกพร่องลงไป ในการทดลองที่ใกล้เคียงกันคือ การลดปริมาณเอนไซม์ cinnamyl alcohol NADPH dehydrogenase (CAD) ในพืช *Populus* sp. พบว่าการลดปริมาณเอนไซม์ CAD นั้น สามารถทำให้ลิกนินละลายในสภาวะเบสอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งเป็นผลดีในการกำจัดลิกนินได้มากขึ้น (Srinivasa *et al.*, 2005) นอกจากนี้ได้มีการทดลองในต้นยาสูบ โดยใช้เทคนิคแอนติเซนส์ เพื่อลดปริมาณเอนไซม์ O-methyl transferase (OMT) ซึ่งพบว่ามีปริมาณของชีวมวลเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ของปริมาณลิกนินในระบบแต่อย่างใด (Blaschke *et al.*, 2004) อีกยุทธศาสตร์หนึ่งในการดัดแปลงลิกนิน คือ การเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนในการผลิตลิกนิน ให้ไปผลิตเป็นสารตัวอื่นแทน ตัวอย่างเช่น การลดปริมาณเอนไซม์ 4-coumarate-CoA ligase (4CL) ใน *Populus tremuloides* นั้นสามารถลดปริมาณลิกนินในระบบได้ 45% และพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลลูโลสในระบบ 15% ซึ่งให้ผลในแนวทางเดียวกับการลดปริมาณเอนไซม์ coniferaldehyde-5-hydroxylase (CAlid5H) ที่สามารถลดปริมาณลิกนินในระบบได้ถึง 52% และมีการเพิ่มปริมาณเซลลูโลสมากถึง 30% สุดท้ายพบว่าการลดปริมาณเอนไซม์ cinnamoyl-CoA reductase (CCR) ในยาสูบนั้น มีปริมาณลิกนินลดลง แต่ปริมาณของไซโลสและกลูโคสในผนังเซลล์เพิ่มขึ้น

จากที่กล่าวมานั้นพบว่า การลดปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์ลิกนิน จึงเป็นอีกแนวทางที่สามารถจะลดความจำเป็นในการปรับปรุงสภาพพืชลงได้ ซึ่งได้มีการเสนอแนวคิดที่จะเข้าไปควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิกนินทั้งสิ้น 6 ชนิดได้แก่ cinnamate-4-hydroxylase (C4H), hydroxycinnamoyl transferase (HCT), 4-hydroxycinnamate-3-hydroxylase (C3H), S-adenosylmethio-9-caffeoyl-CoA/5-hydroxyferuloyl-CoA-O-methyltransferase (CCoA-OMT), ferulate-5-hydroxylase (F5H) และ caffeate O-methyltransferase (COMT) (Chen and Dixon, 2007) แต่ยังไม่สามารถมองข้ามคำถามที่ว่า หากมีปริมาณของลิกนินลดลงแล้ว กระบวนการป้องกันตัวเองจากการรุกรานของศัตรูพืช จะยังคงมีประสิทธิภาพอยู่หรือไม่ ในปัจจุบัน กระบวนการพรีทริทเมนต์ด้วยกรด ด่าง และเอนไซม์ จึงยังเป็นกระบวนการที่จำเป็น และสำคัญในเบื้องต้นของการนำชีวมวลมาใช้อยู่

นอกจากนี้การเพิ่มความสามารถในการละลายของเซลลูโลส ก็ส่งผลให้กระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า แซคคาริฟิเคชัน (saccharification) นั้น มีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วย ตัวอย่างเช่น โครงสร้างคริสตัลไลน์

เซลลูโลส (crystalline cellulose) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่ละลายน้ำ จะขัดขวางการเข้าไปจับของเอนไซม์กับเซลลูโลส จึงได้มีการดัดโครงสร้างคริสตัลไลน์นี้ลง โดยการการผลิตเอนไซม์ cellobiose dehydrogenase (CDH) เดิมลงไป เพื่อไฮดรอลิซิสโครงสร้างคริสตัลไลน์ พบว่าเอนไซม์นี้สามารถดัดโครงสร้างคริสตัลไลน์ลงได้ (Bao and Renganathan, 1992) นอกจากนี้การเพิ่มการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้าง cellulose-binding module (CBM) ในจุลินทรีย์อื่นๆ เพื่อนำมาใช้ในลดโครงสร้างคริสตัลไลน์ ก็เป็นแนวทางที่น่าสนใจ (Shoseyov *et al.*, 2006)

ยุทธศาสตร์ที่ 3 การเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในมวลชีวภาพเพื่อเพิ่มผลิตภัณฑ์เอทานอล

ในระยะหลายสิบปีที่ผ่านมา นักวิจัยได้พยายามศึกษาวิธีการสังเคราะห์เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส จนสามารถคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์ได้มากขึ้น หากแต่ข้อมูลที่ได้ก็ยังไม่เพียงพอที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการศึกษาส่วนใหญ่ยังคงใช้พืชต้นแบบเช่น *Arabidopsis thaliana* ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ยังคงเป็นเพียงการคาดการณ์เท่านั้น ในอนาคตหากสามารถควบคุมปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ได้ จะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลที่เข้าสู่กระบวนการหมักเป็นเอทานอลเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ใช้พื้นที่การปลูกเท่าเดิม ทำให้ต้นทุนในการผลิตเซลลูโลสจากเอทานอลลดลง

นอกจากนี้ข้อเท็จจริงที่ว่า พืชที่มีขนาดใหญ่ และมีการเจริญเติบโตเร็ว ก็จะส่งผลให้ผลผลิตต่อไร่มีปริมาณสูงขึ้นด้วย ซึ่งหมายถึงปริมาณชีวมวลมากขึ้น นับเป็นอีกยุทธศาสตร์หนึ่ง ที่จะสามารถส่งเสริมให้เซลลูโลสจากเอทานอลนั้น มีศักยภาพเพิ่มมากขึ้นด้วย ตัวอย่างเช่น พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถผลิตฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน (gibberellin) มากขึ้น ส่งผลให้มีการเจริญที่รวดเร็วขึ้น และมีปริมาณของชีวมวลที่มากขึ้น (Eriksson *et al.*, 2000) แต่ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชนั้นมีหลากหลาย เช่น ปริมาณธาตุอาหารในดิน ปริมาณน้ำที่เพียงพอ ช่วงเวลา

ระหว่างมืด-สว่าง (circadian) เป็นต้น ส่วนแต่ส่งผลต่อการเจริญของพืชทั้งสิ้น เพราะฉะนั้นไม่ใช่เพียงดัดแปลงพันธุกรรมพืชอย่างเดียวเท่านั้น แต่ต้องศึกษาปัจจัยดังกล่าวควบคู่ไปด้วย จึงจะสามารถส่งผลให้พืชดัดแปลงพันธุกรรมนั้นมีประสิทธิภาพสูงขึ้น การทดลองที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือ ความพยายามในการเพิ่มเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ซึ่งเป็นแหล่งสะสมอาหารของเมล็ดในข้าวด้วยการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *agp* ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ ADP-glucose pyrophosphorylase โดยใช้โปรโมเตอร์ที่จะแสดงออกต่อเมื่ออยู่บริเวณเอนโดสเปิร์ม ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า สามารถเพิ่มปริมาณของชีวมวลทั้งหมดได้ 20% เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวปกติ (Smidansky *et al.*, 2003) แต่กลไกความสัมพันธ์ระหว่างยีน *apg* กับปริมาณชีวมวลทั้งหมด ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน และยังคงมีคำถามที่ตามมา ถึงความสามารถในการเจริญของเมล็ด อัตราการงอกของเมล็ด จากพืชดัดแปลงพันธุกรรมนั้นยังคงปกติหรือไม่ และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างไรในระยะยาว ซึ่งยังคงต้องศึกษากันไป

สรุป

พลังงานทดแทนจะสามารถก้าวเข้ามามีบทบาท ต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์มากขึ้นได้อย่างแน่นอน หากแต่มนุษย์คงต้องรู้จักที่จะเลือกใช้ทรัพยากรที่มีอยู่อย่างจำกัดนั้น ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด ซึ่งเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุศาสตร์นับเป็นเครื่องมือสำคัญหนึ่ง ที่จะช่วยให้สามารถใช้ทรัพยากรได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามยังคงจำเป็นต้องศึกษาวิจัยและพัฒนาต่อไป จากที่กล่าวมาแม้ว่าเทคโนโลยีการผลิตเซลลูโลสจากเอทานอลจะมีศักยภาพสูง แต่ก็ยังเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า แหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตพลังงานนั้นมีอยู่จำกัด ซึ่งหากผลักดันเทคโนโลยีนี้โดยไม่มีการวางแผนที่ดี ก็อาจจะเข้าไปทำลายระบบนิเวศตามธรรมชาติโดยไม่รู้ตัว อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล เข้ามาช่วยปรับเปลี่ยนคุณลักษณะของพืชพลังงาน ให้เหมาะสมต่อ

การเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ จะทำให้การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพมีประสิทธิภาพและความคุ้มค่ายิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Bao, W. and Renganathan, V. 1992. Cellobiose oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* enhances crystalline cellulose degradation by cellulases. *FEBS Lett* 302: 77–80.
- Blaschke, L., Legrand, M., Mai, C. and Polle, A. 2004. Lignification and structural biomass production in tobacco with suppressed caffeic/5-hydroxy ferulic acid O-methyl transferase activity under ambient and elevated CO₂ concentrations. *Physiol Plant* 121: 75–83.
- Chen, F. and Dixon, R.A. 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnol* 25: 759–761.
- Eriksson, M.E., Israelsson, M., Olsson, O. and Moritz, T. 2000. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nature Biotechnol* 18: 784–788.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. and Twyman, R. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 7 : 152–158.
- Mosier, N.S. 2005. Nanoscale, enzyme mimicking catalysts for bioprocessing agricultural residues. [http://cobweb.ecn.purdue.edu/~lorre/16/presentation/doc/enzyme20%20mimetec-mosier%20\(as%20presented\).pdf](http://cobweb.ecn.purdue.edu/~lorre/16/presentation/doc/enzyme20%20mimetec-mosier%20(as%20presented).pdf) (28 February 2010)
- Oraby, H., Venkatesh, B., Dale, B., Ahmad, R., Ransom, C., Oehmke, J. and Sticklen, M. 2007. Enhanced conversion of plant biomass into glucose using transgenic rice-produced endoglucanase for cellulosic ethanol. *Transgenic Res* 16: 739–749.
- Perlack, R.D., Wright, L.L., Turhollow, A.F. and Graham, R.L. 2008. Biomass as feedstock for bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply. *U.S. Department of Energy report*: 1-59.
- Ragauskas, J., Charlotte, K., Williams, B.H., Davison, G.B., John, C., Charles, A.E., William, J. Frederick, Jr., Jason, P.H., David, J.L., Charles, L.L., Jonathan, R.M., Richard, M., Richard, T. and Timothy, T. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311: 484–489.
- Ransom, C., Balan, V., Biswas, G., Dale, B., Crockett, E. and Sticklen, M. 2007. Heterologous *Acidothermus cellulolyticus* 1,4 β -endoglucanase E1 produced within the corn biomass converts corn stover into glucose. *Appl Biochem Biotechnol* 36: 207–220.
- Schillberg, S., Fischer, R. and Emans, N. 2003. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol Life Sci* 60: 433–445.
- Shoseyov, O., Shani, Z. and Levy, I. 2006. Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 283–295.
- Smidansky, E.D., Martin, J.M., Hannah, C.L., Fischer, A.M. and Giroux, M.J. 2003. Seed yield and plant biomass increases in rice are conferred by deregulation of endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* 216: 656–664.
- Srinivasa, R., Fang, C., Gail, S., Lisa, J., Hugh, A. and Richard, A.D. 2005. Targeted down-regulation of cytochrome P450

- enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa L*). *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16573–16578.
- Sticklen, M.B. 2006. Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. *Curr Opin Biotechnol* 17: 315–319.
- Teymouri, F., Alizadeh, H., Laureano-Perez, L., Dale, B.E. and Sticklen, M.B. 2004. Effects of ammonia fiber explosion treatment on activity of endoglucanase from *Acidothermus cellulolyticus* in transgenic plant. *Appl Biochem Biotechnol*. 116: 1183–1192.
- Yamamura, Y., Sahin, F.P., Nagatsu, A. and Mizukami, H. 2003. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a novel apoplastic protein preferentially expressed in a shikonin-producing callus strain of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Physiol*. 44: 437–446.
- Ziegler, M.T., Thomas, S.R. and Danna, K.J. 2000. Accumulation of a thermostable endo-1,4-d glucanase in the apoplast of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Mol Breeding* 6: 37–46.